

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



UNION OF SOVIET
SOCIALIST
REPUBLICS

(19) SU (11) 1084024 A

3(51) A 61 K 37/48

STATE COMMITTEE OF THE USSR
ON DISCOVERIES AND INVENTIONS

DESCRIPTION OF AN INVENTION

for a Certificate of Authorship

(21) 3458316/28-13

(22) 06/25/82

(46) 04/07/84. Byull. No. 13

(72) E.M. Smirnova, V.N. Alekseeva, N.A. Litke, N.Z. Maniya, N.M. Shashkova,
M.M. Nemirovich-Danchenko, O.G. Baidakova, T.I. Davydova, E.A. Semenova, and
V.V. Lebedeva

(71) Leningrad Research Institute of Vaccines and Sera

(53) 577.15 (088.8)

(56) 1. Leaflet from Behringwerke. FRG, Haemaccel, Marburg-Lahn, 1971.

2. USSR Certificate of Authorship No. 897247, Cl. A 61 K 37/48, 1979.

(54) (57) 1. COMPOSITION FOR STABILIZING STREPTOKINASE, which is based on
gelatin and contains sodium chloride and distilled water, characterized in that to increase the
period of preservation of enzyme activity, the composition contains hydrolyzed gelatin
(gelatinol) and in addition, magnesium sulfate with the following proportion of ingredients, % by
weight:

| | |
|-------------------|-------------|
| Gelatinol | 0.2 - 0.6 |
| Sodium chloride | 0.85 - 0.90 |
| Magnesium sulfate | 0.05 - 0.20 |
| Distilled water | Remainder |

2. Composition according to claim 1, characterized in that to increase the preservation of
enzyme activity during lyophilization, it contains in addition 1-4% by weight of aminoacetic
acid.

The invention relates to the technology for the preparation of enzymes for medical use and can be used for stabilizing preparations, the active principle of which is the enzyme streptokinase.

A composition is known for stabilizing streptokinase [1], which includes the following components, % by weight:

| | |
|--------------------|-----------|
| Gelatin | 0.63 |
| Sodium chloride | 0.85 |
| Potassium chloride | 0.038 |
| Calcium chloride | 0.07 |
| Distilled water | Remainder |

Nevertheless, this composition preserves the original fibrinolytic activity of streptokinase for only 24 h.

Also prior in the art is a composition [2] for stabilizing streptokinase based on an aqueous solution of gelatin and containing the following components, % by weight:

| | |
|-----------------------|-----------------|
| Gelatin for injection | 0.25 - 0.45 |
| Sodium chloride | 0.06 - 0.10 |
| Potassium chloride | 0.0025 - 0.0040 |
| Calcium chloride | 0.005 - 0.009 |
| Alanine | 0.5 - 1.5 |
| Distilled water | Remainder |

This composition also does not achieve a long preservation of fibrinolytic activity of streptokinase (this activity is retained for only 72 h). Moreover, because the concentration of mineral components in the last composition is an order [of magnitude] lower than in a physiological solution, the use of the end product for medical purposes is hampered.

The object of the invention is to increase the period of preservation of the fibrinolytic activity of the end product.

This object is achieved in that the composition for stabilizing streptokinase, which is based on gelatin and includes sodium chloride and distilled water, contains hydrolyzed gelatin (gelatinol) and in addition, magnesium sulfate with the following proportion of ingredients, % by weight:

| | |
|-------------------|-------------|
| Gelatinol | 0.2 - 0.6 |
| Sodium chloride | 0.85 - 0.90 |
| Magnesium sulfate | 0.05 - 0.20 |
| Distilled water | Remainder |

To increase the preservation of streptokinase activity during lyophilization, the composition contains in addition 1–4% by weight of aminoacetic acid.

The use of gelatinol instead of gelatin makes possible the medical use of the stabilized preparation, because this molecular form is the basis for the stabilizing composition, approved by the Pharmaceutical Committee of the USSR Ministry of Health for internal administration. Moreover, this base form has a much smaller molecular weight range, which is important for standardizing the end product.

Gelatinol exhibits stabilizing properties only in the presence of magnesium sulfate; if magnesium sulfate is present in the formulation, it is no longer necessary to include potassium chloride and calcium chloride. The indicated sodium chloride concentration achieves an ionic strength in the solution of the end product, which corresponds to a physiological medium.

In stabilizing streptokinase preparations subjected to lyophilization, it is advisable to add in addition 1.0-5.0% by weight of aminoacetic acid to the proposed formulation.

Example 1. The stabilizing composition is prepared by dissolving gelatinol, sodium chloride, and magnesium sulfate crystal hydrate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in distilled water based on the following final concentration of the indicated ingredients, % by weight: gelatinol 0.6; sodium chloride 0.85; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.41 (which achieves a magnesium sulfate content of 0.20); distilled water remainder.

The streptokinase concentrate is diluted with this composition to the final activity of the enzyme of 13,000 U/mL. One part of the stabilizing streptokinase solution is stored at room temperature in liquid form, and the other at the same temperature in a lyophilized state.

This stabilizing composition is the most effective for a liquid preparation.

Example 2. The stabilizing composition is prepared analogous to Example 1 with the same proportion of ingredients. In addition, 4% by weight of aminoacetic acid is added to the composition.

This composition is used for stabilizing preparations with an initial activity of 125,000 and 200,000 U/mL.

The additional introduction of aminoacetic acid enables the preservation of fibrinolytic activity during the lyophilization of streptokinase.

Example 3. The stabilizing composition is prepared by dissolving gelatinol, sodium chloride, magnesium sulfate crystal hydrate, and aminoacetic acid in distilled water based on the following final concentration of the indicated ingredients, % by weight: gelatinol 0.2; sodium chloride 0.9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 (which achieves a magnesium sulfate content of 0.05); aminoacetic acid 1.0; distilled water remainder.

Example 4. The stabilizing composition is prepared according to Example 3 based on the following final concentration of ingredients, % by weight: gelatinol 0.4; sodium chloride 0.85; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 (which achieves a magnesium sulfate content of 0.12); aminoacetic acid 2.0; distilled water remainder.

This proportion of ingredients appears optimal. It allows storage of the streptokinase preparation in lyophilized form for up to 2 years without a significant decline in fibrinolytic activity.

Example 5. The stabilizing composition is prepared by dissolving gelatinol, sodium chloride, and magnesium sulfate crystal hydrate in distilled water based on the following final concentration of the indicated ingredients, % by weight: gelatinol 0.2; sodium chloride 0.87; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 (which achieves a magnesium sulfate content of 0.05); distilled water remainder.

Example 6. The stabilizing composition is prepared by dissolving gelatinol, sodium chloride, and magnesium sulfate crystal hydrate in distilled water based on the following final concentration of the ingredients, % by weight: gelatinol 0.4; sodium chloride 0.8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 (which achieves a magnesium sulfate content of 0.1; distilled water remainder.

This composition is used for stabilizing streptokinase preparations.

The results of testing the fibrinolytic activity of the liquid and lyophilized streptokinase preparations based on storage time, which were treated with the stabilizing composition according to Examples 1–6, are shown in the table (the fibrinolytic activity is given in Konikov units).

Thus, the proposed composition can preserve the fibrinolytic activity of streptokinase for up to 2 years, whereas the prior-art stabilizer preserves this activity for only 1-3 days.

| Example | Initial activity, U/mL | Activity by storage time, U/mL | | | | |
|----------|------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| | | Liquid preparation | | Dry preparation | | |
| | | 2 weeks | 2 months | 2 weeks | 2 months | 2 years |
| 1 | 130,000 (100%) | 126,000 (96.5%) | 120,000 (92.5%) | 90,000 (69.2%) | 60,000 (46.1%) | — |
| 2 | 125,000 | 120,000 (96%) | 118,000 (94%) | 120,000 (96%) | 120,000 (29%) | — |
| | 20,000 | 198,000 (99%) | 190,000 (95%) | 195,000 (98%) | 188,000 (94%) | — |
| 3 | 270,000 | 255,000 (94%) | 245,000 (91%) | 255,000 (94%) | 250,000 (93%) | — |
| | 280,000 | 265,000 (95%) | 263,000 (94%) | 270,000 (96%) | 264,000 (94%) | — |
| 4 | | | | | | |
| 5 tests | 470,000 (100%) | 256,000 (97%) | 446,000(95%) | 451,000 (96%) | — | 428,000 (91%) |
| 64 tests | 250,000 (100%) | 241,000 (96.5%) | — | 244,000 (97.5%) | 238,000 (95%) | — |
| 5 | 350,000 (100%) | 334,600 (95.5%) | 322,700 (92.2%) | 273,300 (67.8%) | 160,000 (45.7%) | — |
| 6 | 250,000 | 242,000 (97%) | 232,200 (92%) | 177,500 (71%) | 120,500 (40%) | — |
| | 500,000 | 471,000 (94%) | 456,500 (91%) | 335,500 (67%) | 221,000 (44%) | — |



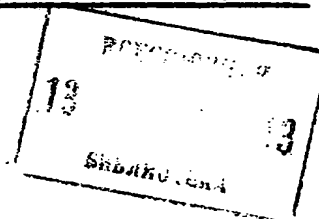
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1084024 A

3(5D) A 61 K 37/48

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- (21) 3458316/28-13
(22) 25.06.82
(46) 07.04.84. Бюл. № 13
(72) Е.М.Смирнова, В.Н.Алексеева,
Н.А.Литке, Н.З.Мания, Н.М.Шашкова,
М.М.Немирович-Данченко, О.Г.Байдакова,
Т.И.Давыдова, Е.А.Семенова
и В.В.Лебедева
(71) Ленинградский научно-иссле-
довательский институт вакцин и сывороток
(53) 577.15(088.8)
(56) 1. Проспект фирмы Behringwerke.
ФРГ, Нафмассел, Marburg-lahn, 1971.
2. Авторское свидетельство СССР
№ 897247, кл. А 61 К 37/48, 1979.
(54) (57) 1. СОСТАВ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ
СТРЕПТОКИНАЗЫ на основе желатины,
содержащий хлористый натрий, дистил-

лированную воду, отличающийся
с я тем, что, с целью увеличения
срока сохранности активности фермента,
состав содержит гидролизованную
желатину (желатиноль) и дополнительно
сернокислый магний при следующем
соотношении ингредиентов, мас. %:

| | |
|-----------------------|-------------|
| Желатиноль | 0,2 - 0,6 |
| Хлористый натрий | 0,85 - 0,90 |
| Сернокислый магний | 0,05 - 0,20 |
| Дистиллированная вода | Остальное |

2. Состав по п. 1, отличаю-
щийся с я тем, что, с целью увеличе-
ния сохранения активности фермента
при лиофилизации, он дополнительно
содержит 1-4 мас. % аминокислот.

(19) SU (11) 1084024 A

Изобретение относится к технологии получения ферментов медицинского назначения и может быть использовано для стабилизации препаратов, действующим началом которых является фермент стрептокиназа.

Известен состав для стабилизации стрептокиназы [1], включающий следующие компоненты, вес. %:

| | |
|-----------------------|-----------|
| Желатин | 0,63 |
| Хлористый натрий | 0,85 |
| Хлористый калий | 0,038 |
| Хлористый кальций | 0,07 |
| Дистиллированная вода | Остальное |

Однако этот состав обеспечивает сохранение исходной фибринолитической активности стрептокиназы лишь в течение 24 ч.

Известен также состав [2] для стабилизации стрептокиназы на основе водного раствора желатины, содержащий следующие компоненты, вес. %:

| | |
|-----------------------|-----------------|
| Желатин для инъекций | 0,25 - 0,45 |
| Хлористый натрий | 0,06 - 0,10 |
| Хлористый калий | 0,0025 - 0,0040 |
| Хлористый кальций | 0,005 - 0,009 |
| Аланин | 0,5 - 1,5 |
| Дистиллированная вода | Остальное |

Данный состав также не обеспечивает длительного сохранения фибринолитической активности стрептокиназы (эта активность сохраняется лишь в течение 72 ч). Кроме того, поскольку концентрация минеральных компонентов последнего состава на порядок ниже, чем в физиологическом растворе, затруднено использование целевого продукта по медицинскому назначению.

Целью изобретения является увеличение срока сохранности фибринолитической активности целевого продукта.

Поставленная цель достигается тем, что состав для стабилизации стрептокиназы на основе желатины, включающий хлористый натрий, дистиллированную воду, содержит гидролизованную желатину (желатиноль) и дополнительно сернокислый магний при следующем соотношении ингредиентов, мас. %:

| | |
|-----------------------|-------------|
| Желатиноль | 0,2 - 0,6 |
| Хлористый натрий | 0,85 - 0,90 |
| Сернокислый магний | 0,05 - 0,20 |
| Дистиллированная вода | Остальное |

С целью увеличения сохранения активности стрептокиназы при лиофилизации, состав дополнительно содержит 1-4 мас. % аминокислоты.

Использование желатиноля вместо желатины обеспечивает возможность медицинского применения стабилизируемого препарата, так как данная молекулярная форма - основа стабилизи-

рующего состава, допущена фармакомитетом Минздрава СССР к внутреннему введению. Кроме того, данная форма основы обладает значительно меньшим разбросом молекулярной массы, что важно для стандартизации целевого продукта.

Причем желатиноль проявляет стабилизирующие свойства только в присутствии сернокислого магния, при наличии в рецептуре сернокислого магния отпадает необходимость в введении хлоридов калия и кальция. Указанная концентрация хлористого натрия обеспечивает ионную силу раствора целевого продукта, соответствующую физиологической среде.

При стабилизации препаратов стрептокиназы, подлежащих лиофилизации, целесообразно в составе предлагаемой рецептуры дополнительно ввести 1,0-5,0 вес. % аминокислоты.

Пример 1. Стабилизирующий состав готовят растворением в дистиллированной воде желатиноля, хлористого натрия и кристаллогидрата сернокислого магния $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ из расчета следующей конечной концентрации указанных ингредиентов, вес. %: желатиноль 0,6; хлористый натрий 0,85; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,41 (что обеспечивает содержание сернокислого магния 0,20); дистиллированная вода остальное.

Этим составом разбавляют концентрат стрептокиназы до конечной активности фермента 13000 ед/мл. Одну часть стабилизированного раствора стрептокиназы хранят при комнатной температуре в жидком виде, а другую - при той же температуре в лиофилизированном состоянии.

Данный стабилизирующий состав наиболее эффективен для жидкого препарата.

Пример 2. Стабилизирующий состав готовят аналогично примеру 1 при тех же соотношениях ингредиентов. В состав дополнительно вносят 4 вес. % аминокислоты.

Этот состав используют для стабилизации препаратов с исходной активностью 125000 и 200000 ед/мл.

Дополнительное введение аминокислот способствует сохранению фибринолитической активности при лиофилизации стрептокиназы.

Пример 3. Стабилизирующий состав готовят растворением в дистиллированной воде желатиноля, хлористого натрия, кристаллогидрата сернокислого магния и аминокислоты из расчета следующей конечной концентрации указанных ингредиентов, вес. %: желатиноль 0,2; хлористый натрий 0,9; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 (что обеспечивает содержание сернокислого маг-

ния, 0,05); аминокусная кислота 1,0; дистиллированная вода остальное.

Пример 4. Стабилизирующий состав готовят согласно примеру 3 из расчета следующей конечной концентрации ингредиентов, вес. %: желатиноль 0,4; хлористый натрий 0,85; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 (что обеспечивает содержание сернокислого магния 0,12); аминокусная кислота 2,0; дистиллированная вода остальное.

Данное соотношение ингредиентов является оптимальным. Оно позволяет хранить препарат стрептокиназы в лиофилизированном виде до двух лет без существенного уменьшения фибринолитической активности.

Пример 5. Стабилизирующий состав готовят растворением в дистиллированной воде желатиноля, хлористого натрия, кристаллогидрата сернокислого магния из расчета следующей конечной концентрации указанных ингредиентов, вес. %: желатиноль 0,2; хлористый натрий 0,87; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 (что обеспечивает содержание сернокислого магния 0,05); дистиллированная вода остальное.

Пример 6. Стабилизирующий состав готовят растворением в дистиллированной воде желатиноля, хлористого натрия и кристаллогидрата сернокислого магния из расчета конечных концентраций ингредиентов, вес. %: желатиноль 0,4; хлористый натрий 0,8; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 (что обеспечивает содержание сернокислого магния 0,1; дистиллированная вода остальное.

Этот состав используют для стабилизации препаратов стрептокиназы.

Результаты контроля фибринолитической активности жидкого и лиофилизированного препаратов стрептокиназы по срокам хранения, обработанных стабилизирующим составом по примерам 1-6 представлены в таблице (фибринолитическая активность дана в единицах Коникова).

Таким образом, предлагаемый состав может обеспечить сохранение фибринолитической активности стрептокиназы до двух лет, тогда как известный стабилизатор позволяет сохранить эту активность лишь в течение 1-3 сут.

| Пример | Исходная активность, ед/мл | Активность по срокам хранения, ед/мл | | | | |
|--------|----------------------------|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| | | Жидкий препарат | | Сухой препарат | | |
| | | 2 недели | 2 мес. | 2 недели | 2 мес. | 2 года |
| 1 | 130000 (100%) | 126000 (96,5%) | 120000 (92,5%) | 90000 (69,2%) | 60000 (46,1%) | - |
| 2 | 125000 | 120000 (96%) | 118000 (94%) | 120000 (96%) | 120000 (96%) | - |
| | 20000 | 198000 (99%) | 190000 (95%) | 195000 (98%) | 188000 (94%) | - |
| 3 | 270000 | 255000 (94%) | 245000 (91%) | 255000 (94%) | 250000 (93%) | - |
| | 280000 | 265000 (95%) | 263000 (94%) | 270000 (96%) | 264000 (94%) | - |
| 4 | | | | | | |
| 5 | 470000 (100%) | 256000 (97%) | 446000 (95%) | 451000 (96%) | - | 428000 (91%) |
| опытов | | | | | | |
| 64 | 250000 (100%) | 241000 (96,5%) | - | 244000 (97,5%) | 238000 (95%) | - |
| опыта | | | | | | |
| 5 | 350000 (100%) | 334600 (95,5%) | 322700 (92,2%) | 273300 (67,8%) | 160000 (45,7%) | - |
| 6 | 250000 | 242000 (97%) | 232200 (92%) | 177500 (71%) | 120500 (48%) | - |
| | 500000 | 471000 (94%) | 456500 (91%) | 335500 (67%) | 221000 (44%) | - |